

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0061066

Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 09월 02일

Date of Application SEP 02, 2003

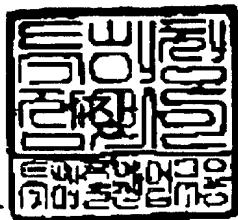
출 원 인 : (주)진매트릭스

Applicant(s) GENEMATRIX INC.

2006년 02월 22일

특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

【서지사항】

【서류명】 명세서 등 보정서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2005. 10. 24

【제출인】

【명칭】 (주)진매트릭스

【출원인코드】 1-2001-003815-8

【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 이상용

【대리인코드】 9-1998-000451-0

【포괄위임등록번호】 2003-072621-9

【대리인】

【성명】 구현서

【대리인코드】 9-2000-000082-0

【포괄위임등록번호】 2002-072598-0

【대리인】

【성명】 류완수

【대리인코드】 9-2000-000135-1

【포괄위임등록번호】 2003-072615-0

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0061066

【출원일자】 2003.09.02

【심사청구일자】 2003.09.02

【발명의 명칭】 염기변이 분석방법

【제출원인】

【발송번호】 9-5-2005-0406656-53

【발송일자】 2005.08.24

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위
와 같이 제출합니다.

대리인	이상용	(인)
대리인	구현서	(인)
대리인	류완수	(인)

【수수료】

【보정료】 3,000원

【추가심사청구료】 0원

【기타 수수료】 0원

【합계】 3,000 원

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 52

【보정방법】 정정

【보정내용】

<52> 소문자로 표기된 부위는 FokI 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로(()) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(dithiothreitol)(PH 7.9, 25°C) 반응 조성 하에서 25°C에서 2시간 연차적으로 45°C에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

【보정대상항목】 식별번호 69

【보정방법】 정정

【보정내용】

<69> 위의 서열에서 소문자로 표시된 부위는 제한효소인지서열이고 밑줄친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로(()) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(dithiothreitol)(PH 7.9, 25°C) 반응 조성 하에서 25°C에서 2시간 연차적으로 45°C에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

【보정대상항목】 청구항 10

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 10】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

a) 단계의 특정 폴리뉴클레오타이드는 B형간염바이러스 중합효소의 활성부위
인 타이로신-메티오닌-아스파테이트-아스파테이트(YMDD)부위를 포함하는 유전자 변
이 분석방법

【보정대상항목】 청구항 11

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 11】

제 1 항 또는 제3 항에 있어서,

a) 단계의 특정 폴리뉴클레오타이드는 C형간염바이러스 5'-비코딩지역(NCR)
부위를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【보정대상항목】 청구항 12

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 12】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

a) 단계의 특정 폴리뉴클레오타이드는 인간 마스핀(maspin) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 또는 3597번째 염기부위를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【보정대상항목】 청구항 13

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 13】

프라이머 결합서열1, 제한효소인자서열, 및 프라이머결합서열2를 포함하되 제한효소인자서열을 인지하는 2개 이상의 제한효소에 의해 절단된 폴리뉴클레오타이드 절편이 변이서열을 포함하고 절편의 크기가 2 - 32개 염기의 크기를 갖도록 구성된 유전자변이분석용 프라이머를 포함하는 유전자변이분석용 키트.

【보정대상항목】 청구항 14

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 14】

제 13 항에 있어서,

상기 유전자변이분석용 프라이머는 포워드 프라이머이며, 서열정보2, 7, 12,

20, 25 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 키트.

【보정대상항목】 청구항 15

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 15】

제 13 항에 있어서,

상기의 제한효소들은 서로 같은 또는 서로 다른 최적온도를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 키트.

【보정대상항목】 청구항 16

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 16】

제 13 항 또는 제 15 항에 있어서,

상기의 제한효소들은 서로 다른 최적온도를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 키트.

【보정대상항목】 청구항 17

【보정방법】 정정

【보정내용】**【청구항 17】**

제 16 항에 있어서,

상기의 제한효소는 Fok1, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 및 Bae I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 낮은 최적온도를 갖는 제한효소와 BstF5 I, Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 및 Apo I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 높은 최적온도를 갖는 제한효소인 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 키트.

【보정대상항목】 청구항 18**【보정방법】** 정정**【보정내용】****【청구항 18】**

제 13항 또는 제 14 항에 있어서,

상기의 프라이머는 인간 마스핀(maspin) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 또는 3597번째 염기의 변이분석, 라미부딘 내성 B형 간염바이러스 변위분석 또는 C형 간염바이러스의 유전자형 변이분석에 사용되는 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 키트.

【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.09.19

【제출인】

【명칭】 (주)진매트릭스

【출원인코드】 1-2001-003815-8

【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 황의인

【대리인코드】 9-1998-000660-7

【대리인】

【성명】 구현서

【대리인코드】 9-2000-000082-0

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0061066

【출원일자】 2003.09.02

【심사청구일자】 2003.09.02

【발명의 명칭】 염기변이 분석방법

【제출원인】

【발송번호】 1-5-2003-0058020-95

【발송일자】 2003.09.13

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 첨부서류

【보정방법】 제출

【보정내용】

【첨부서류】 1. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다.

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】

【합계】 0 원

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.09.02
【발명의 국문명칭】	염기변이 분석방법
【발명의 영문명칭】	Method for detecting base mutation
【출원인】	
【명칭】	(주)진매트릭스
【출원인코드】	1-2001-003815-8
【대리인】	
【성명】	황의인
【대리인코드】	9-1998-000660-7
【대리인】	
【성명】	구현서
【대리인코드】	9-2000-000082-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김남근
【성명의 영문표기】	KIM, Nam Keun
【주민등록번호】	611012-1541119
【우편번호】	463-777
【주소】	경기도 성남시 분당구 서현동 시범 현대아파트 402동 1104 호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김석준
【성명의 영문표기】	KIM, Suk Joon
【주민등록번호】	670801-1056122

【주민등록번호】 580126-1005710
 【우편번호】 411-707
 【주소】 경기도 고양시 일산구 대화동 2234 장성마을 303-804
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이창홍
 【성명의 영문표기】 LEE, Chang Hong
 【주민등록번호】 420128-1037613
 【우편번호】 135-270
 【주소】 서울특별시 강남구 도곡동 152-1 삼익빌라 1차 101호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정현재
 【성명의 영문표기】 CHUNG, Hyun Jae
 【주민등록번호】 721012-1114211
 【우편번호】 435-010
 【주소】 경기도 군포시 당동 쌍용아파트 101-106
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 지미선
 【성명의 영문표기】 JEE, Mi Sun
 【주민등록번호】 770406-2030510
 【우편번호】 142-868
 【주소】 서울특별시 강북구 번동 466-28 4층
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 황성규
 【성명의 영문표기】 HWANG, Seong Gyu

【주민등록번호】	570706-1026031
【우편번호】	138-050
【주소】	서울특별시 송파구 방이동 올림픽선수촌아파트 134동 1601
	호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍선포
【성명의 영문표기】	HONG, Sun Pyo
【주민등록번호】	680825-1026210
【우편번호】	137-754
【주소】	서울특별시 서초구 방배3동 삼익아파트 5-301
【국적】	KR
【우선권 주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2002-0063832
【출원일자】	2002.10.18
【증명서류】	첨부
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2003.03.31
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	학술단체 서면 발표
【공개일자】	2003.05.30
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	33
【서열목록의 전자문서】	첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다.

대리인

황의인 (인)

대리인

구현서 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	33	면	33,000	원
【우선권주장료】	1	건	26,000	원
【심사청구료】	18	항	685,000	원
【합계】			773,000	원
【감면사유】			소기업(70%감면)	
【감면후 수수료】			250,100	원
【첨부서류】			1. 요약서 · 명세서(도면)_1통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 생명체의 유전자 염기변이를 정확하고 효율적으로 조사하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

염기변이 분석방법{Method for detecting base mutation}

【도면의 간단한 설명】

<1> 도 1은 인간의 maspin(serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<2> 도 2는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<3> 도 3은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 헤테로인 경우(C/T)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<4> 도 4는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 헤테로인 경우(C/T)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<5> 도 5는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 모두 T로 변이된 경우(T/T)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<6> 도 6은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 모두 T로 변이된 경우(T/T)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<7> 도 7은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기가 정상인 경우(C/C)의 7mer와 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

<8> 도 8은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기가 헤�테로인

경우(C/T)의 7 mer와 13 mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림

<9> 도 9는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기가 모두 T로 변이된 경우(T/T)의 7 mer와 13 mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 생명체의 유전자분석은 질병에 대한 위험도, 진단, 예진 또는 치료방법의 제시 등과 관련하여 광범위하게 사용되고 있다. 예를 들어, 특정인의 특정유전자에 대한 변이분석을 통하여 질병에 대한 위험도가 어느 정도인지 예측하여 예방노력을 하도록 유도할 수 있다. 또는 생명체에 감염을 일으키는 다른 생명체 예컨대, 바이러스 등의 유전변이 분석을 통하여 그 바이러스가 치료약물에 대해 내성을 같는지의 여부를 조사함으로써 효과적인 치료를 유도할 수 있다. 본 발명은 생명체의 유전자를 분석하는 방법에 관한 것으로서, 특별히 유전변이를 조사하는 방법에 관한 것이다.

<11> 인간의 지놈지도가 완성되어 가면서 질병에 대한 위험도의 측정, 질병의 진단 또는 예진, 그리고 약물에 대한 반응의 예측을 보다 광범위하게 할 수 있다는 가능성이 제시되고 있다. 다수의 개체를 대상으로 지놈단위의 염기서열분석을 하면 개체간 다양성을 보이는 염색체상의 위치들이 나타나는데 이를 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다. SNP는 생명체의 염색체에 배열되어 있는 염기

서열 중 일정 빈도 이상으로 나타나는 변이로서, 인간의 경우 약 1,000개 염기마다 1개 정도의 확률로 나타난다고 한다. 인간의 염색체 크기를 고려할 때, 수백만의 SNP가 존재하는 것이다. SNP는 개체간의 형질차이를 설명하는 수단으로 여겨지고 있어 질병의 원인을 규명하여 병을 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

<12> 인간 지놈프로젝트에 의해 발견된 SNP들은 개체간 다양성을 보인다는 사실만을 보여줄 뿐 그 다양성이 질병과 어떤 관련성이 있는지를 알려주지는 않는다. SNP와 질병과의 관계를 밝히기 위해서는 정상인과 환자에게서 나타나는 SNP의 변이 형태를 비교 분석(SNP스코링)하는 과정이 필요하다. SNP와 질병과의 관계를 명확하게 규명하기 위해서는 많은 수의 SNP를 분석하여야 할 뿐만 아니라, 변이를 오류없이 분석할 수 있어야 한다.

<13> SNP스코링 방법으로는 DNA시퀀싱, PCR-SSCP(Polymerase chain reaction -Single stranded conformation polymorphism), 알렐특이적혼성화 (allele specific hybridization), 올리고리게이션 (oligo-ligation)법, 미니시퀀싱(mini-sequencing) 그리고 효소절단법에 의한 것들이 있다. DNA칩을 이용한 방법도 소개되고 있는데 원리적으로 알렐특이적혼성화와 다르지 않고, 다만 올리고뉴클레오타이드 프로브 등을 부착하는 고정상에 차별을 둔 것이다.

<14> DNA시퀀싱은 맥삼-길버트법과 생거법이 있으나 현재는 후자의 방법이 주로 사용되고 있다. 이 방법은 특정위치의 유전변이 여부만을 조사하기 위한 방법이라 기보다는 유전자 전체 또는 일부 부위의 염기서열을 밝히기 위한 방법이지만, 염기서열을 밝히면 특정 위치의 유전변이 여부도 확인할 수 있으므로 SNP스코링에 사용

될 수 있다. 그러나, 조사하고자 하는 SNP의 변이만을 확인하는 것이 아니라 굳이 조사하지 않아도 되는 주변의 염기서열을 함께 읽는다는 면에서 비효율적이다.

<15> PCR-SSCP(Orita, M. et.al, Genomics, 1989, 5:8874-8879)는 PCR로 분석하고자 하는 SNP를 포함하는 서열을 증폭한 후, 각각의 체인으로 분리시킨 다음, 폴리아크릴아마이드 젤에서 전기영동을 수행한다. 1염기의 차이에 의하여 DNA 체인의 2차 구조가 달라지므로 이 차이에 기인한 전기영동 이동속도 차이에 따라 염기변이 여부를 조사한다.

<16> 알렐특이적 혼성화는 나일론 필터 등에 부착된 프로브에 방사선동위원소 등으로 표지된 샘플DNA를 혼성화하되, 온도 등 혼성화의 조건을 조절함으로써 염기변이의 여부를 조사하는 방법이다.

<17> 올리고리게이션법(Nucleic Acid Research 24, 3728, 1996)은 주형DNA와 상보적이지 않은 상태에서는 리게이션(ligation)이 일어나지 않는 조건에서 반응을 수행하고 리게이션이 진행되었는지를 확인함으로써 염기변이를 조사하는 방법이다.

<18> 미니시이퀀싱(Genome Research 7:606, 1997)은 변이 여부를 조사하고자 하는 위치의 1개의 염기만이 중합되도록 조건을 맞추고 중합된 1개의 염기가 무엇인가에 따라 검출반응이 다르도록 고안된 방법으로 SNP스코링을 위해서 개발된 방법이다.

<19> PCR-SSCP, 알렐특이적 혼성화, 올리고리게이션법 등은 폴리아크릴아마이드 젤을 사용하여 많은 양의 샘플을 분석하기에 불편하거나, 프로브가 원하는 위치에 결합하지 못해서 발생하는 오류를 확인하지 못한다는 문제점이 있다.

<20> 미니시퀀싱은 SNP스코링을 위해 개발된 기술이어서 분석이 간편하고 많은 양의 샘플 분석에 유리하지만, 오류에 의한 잘못된 결과를 확인하지 못하는 단점을 여전히 가지고 있고 염기의 결실(deletion)과 삽입(insertion)을 알아낼 수 없다는 한계가 있다.

<21> SNP스코링을 위해 개발된 기술 중 또 하나의 방법으로 효소절단법이 있다 (WO 01/90419). 이 방법은 분석하고자 하는 염기서열을 PCR과 같은 방법으로 증폭을 하되, 증폭된 결과물이 두 개의 제한효소에 의해 절단되거나 인지될 수 있는 염기서열을 포함하도록 한다. 증폭된 결과물을 두 가지의 제한효소로 절단하여 생성된 단편의 분자량을 측정하여 염기변이의 여부를 측정하는 방법이다. 이 분석방법은 PCR에 의한 유전자의 증폭 후 즉시 제한효소반응으로 단편을 만들어 mass spectrometry 등으로 분자량을 측정하므로 분석단계가 간편하고 빠른 장점을 가지고 있다. 그러나, WO 01/90419에 기재된 효소절단법은 여전히 오류에 의한 잘못된 분석을 확인하지 못한다. 예를 들어, PCR 수행시 프라이머가 원하지 않은 위치에 결합할 경우 잘못된 분석결과를 초래할 수 있는데, 원하지 않은 위치에 결합하였는지 확인할 수 없다는 문제가 있다. 예를 들어, CYP2C9의 염기변이를 조사하기 위하여 사용한 프라이머가 CYP2C8에 결합하게 될 수 있는데, 이 경우 프라이머가 CYP2C9이 아닌 CYP2C8에 결합하였다는 사실을 확인할 수 없어 오류가 발생하였는지 여부를 확인하기 어렵다. 또한, 1염기가 다른 염기로 치환되는 변이는 검출이 가능하나, 염기의 결실(deletion) 또는 삽입(insertion)에 의한 변이는 검출하지 못한다는 문제점이 있다. 또한, 인접한 두 개 이상의 염기변이를 동시에 검출할 수

없다는 문제점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 생명체의 유전변이를 정확하게 그리고 효율적으로 조사할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<23> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 생명체의 유전변이를 정확하고 효율적으로 분석하는 방법을 제공한다.

<24> 본 발명을 간단히 설명하면 본 발명은 많은 시료의 염기변이 조사자를 간편하고 빠르게 수행하면서도 프라이머가 잘못된 위치에 결합하여 생성될 수 있는 오류를 검증할 수 있도록 함으로써 정확한 염기변이 조사자를 가능하도록 하고 32개 염기 범위 이내로 인접한 여러 염기의 변이를 동시에 조사할 뿐만 아니라 결실 또는 삽입에 의한 유전변이도 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 특별히, 한 생명체 내에 여러 유전형이 동시에 존재하는 경우, 서로 다른 위치의 염기 변이가 한 유전형에 동시에 존재하는지, 아니면 서로 다른 유전형에 혼재되어 존재하는지를 구별할 수 있다. 예를 들어, 인간은 동일한 유전정보를 담고 있는 염색체가 2개(1쌍)씩 존재하고 있어, 유전변이가 일어나는 경우 2개의 염색체에 모두 변이가 있을 수도 있지만(호모), 하나의 염색체에만 일어날 수도 있다(헤테로). 인접한 2개 이상의 염기 변이가 모두 헤테로인 경우, 두 염기변이가 하나의 염색체에 동시에 존재할 수도

있지만, 서로 다른 염색체에 존재할 수도 있다. 두 가지 경우가 생명체에 미치는 영향을 다를 수 있으므로 이를 구별할 필요가 있다. 인간을 감염시키는 바이러스의 경우에도 여러 가지의 유전형이 존재되어 존재할 수가 있다. 인접한 두 개 이상의 염기변이가 모두 헤테로인 경우, 두 염기변이가 하나의 유전형에 동시에 존재하는 아니면 서로 다른 유전형에 나누어 존재하는지를 구별할 필요가 있다.

<25> 본 발명은 유전변이를 분석하기 위하여 그 결과물이 제한효소로 절단될 수 있는 부위를 포함하도록 원하는 염기서열을 증폭하되 제한효소에 의해 절단된 단편의 염기의 수가 32개 이하가 되도록 하고 그 중 적어도 1개의 염기는 프라이머가 아닌 주형(template)의 복제에 의해 생성되도록 하고, 증폭된 생성물을 제한효소로 절단한 다음 분자량을 측정함으로써 유전변이를 분석하는 방법을 제공한다.

<26> 즉 본 발명은 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 이용하여 특정 폴리뉴클레오타이드를 증폭하는 단계; 상기 증폭된 특정 폴리뉴클레오타이드를 제한효소로 절단하여 2 - 32개 염기의 크기를 가지면서 변이서열을 포함하는 2가지 이상의 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드 절편을 생성하는 단계; 및 상기 절단된 절편의 분자량을 측정하는 단계를 포함하는 유전자 변이 분석방법을 제공한다.

<27> 본 발명에서 서로 다른 2개 이상의 염기변이 중 한 변이는 하나의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 절편에만 존재하고, 또 다른 단일가닥 뉴클레오타이드 절편에는 2개 이상의 염기변이를 모두 포함하도록 절단하는 것이 바람직하다. 예를 들어, ...ATG... 라는 서열 중에서 A 와 G가 변이서열인 경우, 제한효소 절단에 의해 생성된 제1의 단일가닥 뉴클레오타이드는 두 개의 변이서열 중 A만을 포함하고 있고

제2의 단일가닥 뉴클레오파이드는 A와 G를 모두 포함하도록 절단하는 경우이다.

<28> 본 발명은 유전변이를 분석하기 위하여 그 생성물이 제한효소로 절단될 수 있는 부위를 포함하도록 원하는 염기서열을 증폭하되 아래의 그림과 같은 구조의 단편을 만드는 방법을 제공한다.

5'-	프라이머 결합서열1	제한효소 인지서열	프라이머 결합서열2	변이전 서열	변이서열	변이후서열	프라이머 결합서열3	- 3'
-----	---------------	--------------	---------------	-----------	------	-------	---------------	------

<30> '제한효소인지서열'은 서로 다른 제한효소에 의해 동시에 또는 인접하여 인지되는 서열로서 절단되는 서열과 일치하지 않을 수 있다. 예를 들어, Fok1 과 BstF5I 은 모두 GGATG 서열을 인지하나 절단되는 위치는 인지서열의 3' 말단으로부터 각각 9번째/13번째와 2번째/0번째 염기의 다음이다. 제한효소인지서열을 인지하는 본 발명에서 사용될 수 있는 두 제한효소는 본 발명의 목적에 사용될 수 있는 모든 제한 효소 즉 서로 같은 최적온도 또는 서로 다른 최적 온도를 갖는 제한 효소가 가능하며, 그 중에서도 서로 다른 최적온도를 가지고 있는 것이 더욱 바람직하며, 상대적으로 낮은 최적온도를 갖는 제한효소로, Fok1, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 또는 Bae I이 바람직하며, 상대적으로 높은 최적온도를 갖는 제한효소로 BstF5 I, Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 또는 Apo I이 바람직하고, Fok1 및 BstF5 I 쌍이 가장 바람직하다.

<31> 제한효소 Bae I는 25 °C, Fok1, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, MmeI I 및 AvaII는 37 °C의 상대적으로 낮은 최적온도를 갖고, BstF5 I 및 Taq I는 65

°C, BsaB I, Btr I 및 BstAP I는 60 °C, Fau I는 55°C, Bcl I, Pci I 및 Apo I는 50 °C의 상대적으로 높은 최적온도를 갖는다.

<32> PCR증폭에 사용하는 두 프라이머 중 하나는 프라이머결합서열1, 제한효소인지서열 그리고 프라이머결합서열2로 이루어져 있으며, 나머지 하나는 프라이머결합서열3로 이루어져 있다.

<33> '프라이머결합서열'은 주형이 되는 핵산과 상보적으로 결합할 수 있는 서열이지만, 제한효소인지서열은 핵산과 상보적이지 않을 수 있다. 프라이머결합서열1, 2 그리고 3은 프라이머가 template DNA 와 결합하기 위해서는 적어도 4개 이상이어야 하므로 그 염기의 수가 4개 이상이어야 하며, 8-30개의 크기에서 template DNA 와 가장 잘 결합하였기 때문에 8개 이상 30개 이하인 것이 바람직하다. '변이전서열'은 조사하고자 하는 염기변이의 5'쪽의 서열이다. '변이서열'은 조사하고자 하는 염기의 변이에 해당하는 서열이다. 염기의 치환, 삽입, 결실이 일어날 수 있는데, 염기의 수는 1개인 것이 보통이나 2개 이상인 경우도 있다. '변이후서열'은 변이서열의 3'쪽의 서열이다.

<34> 변이전서열과 변이후서열을 합하여 1개 이상인 것이 바람직하다. 제한효소 절단 후 생성되는 절편은 변이서열을 포함하고 있어야 하고, 절편의 염기의 수는 2 ~ 32 개인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 12개의 염기를 가지는 것이 좋다. 절단된 절편의 크기를 수치한정한 이유는 매스 스펙트로메트리로 분석할 때, 분석 결과가 양호한 절편의 사이즈를 반영한 것이다. 32개를 초과하는 크기를 갖는 절편

은 매스 스펙트로메트리를 이용하여 분자량을 계산함으로써 염기변이를 조사하기에는 너무 크므로 상기와 같은 절편의 염기수가 바람직하다. 또한, 1개의 염기만으로 이루어진 절편인 경우에는 변이서열만을 포함하고 있는 것이므로 프라이머가 잘못된 위치에 결합한 것인지를 확인하기 어렵게 하므로 바람직하지 않다. 두 제한효소가 동일한 또는 인접한 부위를 인지하므로 두 제한효소 중 어느 하나의 반응이 진행되는 동안에 다른 또 하나의 제한효소는 작용하지 않는 것이 바람직하다. 이러한 경우 증폭된 생성물을 제한효소로 절단할 때, 두 제한효소의 최적온도를 감안하여 서로 다른 온도에서 연이어 반응시킬 수 있다. 또는 하나의 제한효소로 먼저 절단하고 난 후 나머지 효소로 절단할 수도 있다. 이 때, 먼저 사용하는 제한효소에 의한 절단이 변이서열을 포함하는 절편에 존재하는 두 번째 제한효소의 인지서열이나 절단위치를 제거하거나 손괴하여서는 아니된다.

<35> 실시예1. 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기의 염기변이

<36> 인간의 암전이 억제 유전자로 알려진 maspin (serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기 (rs1509477; 염색체 18번의 61001755번째 염기) 의 변이를 조사하였다.

1. PCR 증폭과 제한효소 절단

<38> Template DNA의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<39> GTTCACTTGATAAAGCAATAAAATGCTATTCAcAGCTGCATGAGGCTACACCCTCTTTGAATGCAG
(서열정보1)

<40> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 1과 2가 결합하는 부위들이다. 소문자로 표기된 염기는 '변이서열'이다.

<41> 프라이머 1. 5'- TCACTTGATAAAGCAATAAAAgatgGCTATTCA - 3' (34mer)(서열정 보2)

<42> 프라이머 2. 5'- CATTCAAAAGAAGGGTGTAGCCTCATGC - 3' (28mer)(서열정보3)

<43> 소문자로 표기된 서열은 Fok1 및 BstF5I의 인지서열이다.

<44> PCR buffer(1x), MgSO₄ 2 mM, dNTP 200 mM, Platinum Taq

Polymerase(Invitrogen, 10966-026) 0.315U, 프라이머 1과 2 각각 0.5 uM, 지놈DNA 36 ng 을 넣고 총 반응부피를 18 uL로 맞춘다. 그리고 다음의 조건으로 PCR반응을 수행한다.

<45> 94°C 2분,

<46> 94°C 15초 55°C 15초 72°C 30초(10 cycles),

<47> 94°C 15초 60°C 15초 72°C 30초(35 cycles)

<48> 지놈DNA는 혈액으로부터 추출하여 통상적인 방법에 따라 순수 분리한다. 예를 들어, 'SDS/단백질분해효소K' 방법을 사용할 수 있다.(Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harber Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) 또는 QIAamp DNA Mini Kit 250(Qiagen 51106) 을 사용하여 혈액으로부터 DNA를 분리할 수 있다. DNA의 농도가 낮을 경우 다음과 같은 방법으

로 DNA를 농축하여 사용할 수 있다. DNA 용액에 1/10 부피의 3M Sodium acetate (pH 5.3)과 2.5 부피의 에탄올을 넣고 부드럽게 섞은 다음 - 20℃에서 1시간 이상 동안 방치한다. 4℃, 13000 rpm에서 15분 동안 원심분리한다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 70% 에탄올을 넣고 4℃, 13000 rpm에서 10분 동안 원심분리한다. 에탄올을 건조시킨 다음 원하는 부피의 증류수를 넣어 녹인다.

<49> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→ 3').

<50> TCACTTGATAAAGCAATAAAAggatgGCTATTCA[C/T]AGCTGCATGAGGCTACACCCTCTTTGAATG
(서열정보 4)

<51> AGTGAACATTTCGTTATTTcct acCGATAAGT[G/A]TCGACGTACTCCGATGTGGGAAGAAAACTTAC
(서열정보5)

<52> 소문자로 표기된 부위는 Fok1 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로([]) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(PH 7.9 @ 25℃) 반응 조성 하에서 25℃에서 2시간 연차적으로 45℃에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

<53> 효소반응의 최적화를 위하여, 증폭된 생성물을 Fok1과 BstF5I으로 25℃, 37℃, 45℃, 55℃, 65℃에서 각각 반응한 결과 Fok I의 경우는 25℃에서 70%, 37%

에서 90%이상 반응이 진행되는 것으로 확인이 되었다. 아울러 BstF5I의 경우는 25 °C 제외한 온도에서 효소반응이 진행됨이 확인되었다. 따라서, FokI 만 작용할 수 있는 온도인 25°C에서 먼저 반응시키고 난 다음 BstF5I이 반응할 수 있는 온도인 37°C 이상에서 반응시키는 것이 바람직하다.

<54>

2. 정제 및 탈염

<55>

제한효소를 처리한 위의 용액으로부터 DNA절편을 순수분리한 다음 분자량을 측정하는 것이 바람직하다. 예를 들어, Nuclease Genotyping Kit (variagenics, USA) 를 사용할 수 있다. 먼저, 제한효소 반응액에 1M TEAA(Triethylammoniumacetate, pH 7.6) 70 μl를 넣어 1분간 둔다. Sample Preparation Plate에 1M TEAA 70 μl와 위의 혼합액 90 μl를 차례로 넣어 통과한 후에 0.1M TEAA 85 μl를 5차례 완전히 통과시킨다. Sample Preparation Plate 를 1000 rpm에서 5분간 원심분리한다. Collection Plate 위에 Sample Preparation Plate 을 위치시키고 60% isopropanol 60 μl을 넣어 통과시킨다. 용출액이 Collection plate 에 모아지면 Collection Plate를 115 °C에서 75분간 건조시킨다.

<56>

3. MALDI-TOF 매스 스펙트로메트리

<57>

Collection plate 에 MALDI matrix(22.8 mg ammonium citrate, 148.5 mg hydroxypicolinic acid, 1.12 ml acetonitrile, 7.8 ml H₂O) 6 μl 를 넣은 후 그

중 $4\mu l$ 를 MALDI-TOF(Biflex IV, Bruker) 의 Anchor chip plate 에 얹는다. 37°C 에서 30분 동안 건조시키고 실온에 잠시 두어 열을 식힌 후 MALDI-TOF 으로 분석한다. 분석방법은 MALDI-TOF의 매뉴얼을 따른다.

<58> 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C), 효소절단 후 생성되는 절편의 분자량은 2135.4 D (7 mer)과 4078.6(13 mer) D 이다(도1 및 도2). 혜테로인 경우(C/T), 생성되는 절편의 분자량은 2135.4 D, 2150.4 D(이상 7 mer), 4078.6 D 그리고 4062.6 D (13 mer) 이다(도3 및 도4). 한편, 모두 T로 변이된 경우(T/T), 절편의 분자량은 2150.4 D(7 mer) 과 4062.6 D (13 mer) 이다(도5 및 도6).

<59> 실시예 2. 인간의 암전이 억제 유전자로 알려진 maspin (serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기 (rs1396782; 염색체 18번의 61002611번째 염기)의 변이

<60> Template DNA 의 서열은 아래와 같다.

<61> CTGGAGTATTATCCTTGCAGGCTTGATATGAAGcTTGAAATTCTCCCCAAAGAGATTAGTTAACAGGCA
AA(서열정보 6)

<62> 위의 서열에서 밑줄친 부위는 아래의 프라이머3과 4가 각각 결합하는 부위이다. 소문자로 표기된 변이가 '변이서열'이다.

<63> 프라이머 3. 5' GAGTATTATCCTTGCAGGCTTggatgATATGAAG 3' (34 mer)(서열정보 7)

<64> 프라이머 4. 5' - GCCTGTTAACTAAATCTCTTGGGGAGAA 3'(29 mer)(서열정보 8)

<65> 위의 프라이머에서 소문자로 표기된 부위는 Template DNA에 존재하지 않는 서열로서 Fok1 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이다. PCR 반응을 포함한 실험방법은 실시예1과 동일하다.

<66> PCR을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다.(5'->3')

<67> GAGTATTATCCTGCAGGCTTggatgATATGAAG[C/T]TTGAAATTCTCCCCAAAGAGATTAGTTAAC
AGGC(서열정보 9)

<68> CTCATAATAGGAACGTCCGAAcctacTATACTTC[G/A]AACTTAAAGAGGGTTCTCAAATCAATTG..
..TCCG(서열정보 10)

<69> 위의 서열에서 소문자로 표시된 부위는 제한효소인자서열이고 밑줄친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로([]) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(PH 7.9 @ 25°C) 반응 조성 하에서 25°C에서 2시간 연차적으로 45°C에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

<70> 4번째 인트론의 3597번째 염기가 정상인 경우(C/C), 효소절단 후 생성되는 절편의 분자량은 2209.4 D (7 mer)과 3988.6(13 mer) D 이다(도 7). 헤테로인 경우 (C/T), 생성되는 절편의 분자량은 2209.4 D, 2224.4 D(이상 7 mer), 3988.6 D 그리

고 3972.6 D (13 mer) 이다(도 8). 한편, 모두 T로 변이된 경우(T/T), 절편의 분자량은 2224.4 D(7 mer) 과 3972.6 D (13 mer) 이다(도 9).

<71> 실시예3: B형간염바이러스 DNA 중합효소의 타이로신-메티오닌-아스파테이트-아스파테이트(YMDD) 부위 염기변이

<72> 인간에게 B형 간염을 유발시키는 B형간염바이러스의 DNA 중합효소 유전자 내에 위치하는 YMDD부위의 염기 변이를 조사하였다. 이 부위의 염기변이에 의하여 B형간염의 치료제인 라미부딘에 대한 내성이 발생한다. 552번 코돈인 메티오닌(M)이 발린(V) 또는 이소루이신(I)로 변한 경우에 라미부딘에 대한 내성이 생기는 것으로 알려져 있다.

<73> 1. PCR 증폭과 제한효소 절단

<74> QIAamp blood kit(Qiagen, CA)를 사용하여 B형간염바이러스의 DNA를 혈청 0.2 ml 으로부터 추출하고, 이 중 2 μ l를 PCR 증폭에 사용한다.

<75> Template DNA의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<76> TTCCCCCACTGTTGGCTTCAGTTATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTA(

<77> 밀줄최 서열들은 아래의 프라이머 5와 6이 결합하는 복위들이다.

<78> 프라이머5(서열점보12), 5'- TTCCCCCACTGTTGGCTggatgcTCAGTTAT - 3' (31mer)

<79> 프라이머6(서열점보13) 5'- TACAGACTTGGCCCCCAATACCACATGATC - 3' (30mer)

<80> 프라이머5에서 소문자로 표기된 서열은 Fok1 및 BstF5I의 인지서열로서 Template DNA에는 없는 것을 인위적으로 삽입한 서열이며, 프라이머6에서 밀줄친 서열은 Fok1에 의해 인지되는 것을 방지하기 위하여 인위적으로 변경한 서열이다.

<81> 20mM TrisHCl(pH 8.4), 50mM KC1, 0.2 mM dNTP, 0.4U Platinum Taq Polymerase(Invitrogen, 10966-026), 프라이머 5와 6 각각 10 pmol를 함유한 반응 용액 18 u1를 사용하여 다음의 조건으로 PCR반응을 수행한다.

<82> 94℃ 2분,

<83> 94℃ 15초 50℃ 15초 72℃ 30초(10 cycles),

<84> 94℃ 15초 55℃ 15초 72℃ 30초(35 cycles)

<85> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→ 3').

<86> TTCCCCCACTGTTGGCTggatgTCAGTTATATGGATCATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTA(서열정 보14)

<87> AAGGGGGTGACAAACCGAcct acAGTCAATATACCCTAGTACACCATAACCCCCGGTTCAAGACAT(서열정 보15)

<88> 소문자로 표기된 부위는 Fok1 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밀줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이다. PCR 반응물을 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U 및 반응용액(50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT) 10ul 과 혼합하여 37℃에서

2시간, 그리고 45°C에서 2시간 동안 반응을 실시한다. 37°C에서 2시간 동안 FokI으로 먼저 절단한 다음, BstF5I을 넣어주어 45°C에서 2시간 동안 절단할 수도 있다.

<89> 2. 정제 및 탈염과 MALDI-TOF 매스 스펙트로메트리

<90> 실시 예1과 동일한 방법으로 수행한다.

<91> 효소절단에 의해 생성되는 절편의 계산상 크기와 실제 분자량분석에 의해 측정한 값은 0.1% 이하의 차이를 보일 정도로 정확하게 일치하였다.(표1.)

<92> [표 1] PCR 산물의 제한효소절단에 의한 오리고뉴크레오타이드의 예상 및 관찰 질량

지노타임 552번 코드	예상 절편의 서열		예상 절편의 질량 (Da)		관찰된 절편의 질량(Da) ^a		
	7 mer	13mer	7 mer	13mer	7 mer	13mer	
YMDD	aTg	AGTTATA	TCcAtATAACTGA	2199.4	3997.6	2199.6	3998.0
YVDD	gTg	AGTTATg	TCcAcATAACTGA	2215.4	3982.6	2215.9	3982.6
YIDD	aTt	AGTTATA	TCaAtATAACTGA	2199.4	4021.6	2199.6	4021.8
YIDD	aTc	AGTTATA	TCgAtATAACTGA	2199.4	4037.6	2199.6	4038.0
YIDD	aTa	AGTTATA	TOAAtATAACTGA	2199.4	4012.6	2199.6	4012.6

<94> 상기 표에서 해상도(관찰된 질량과 예상질량의 차이를 예상질량으로 나눈 것)는 모두 0.1%이하이다.

<95> 실시 예4: C형 간염바이러스의 5'NCR(Non Coding Region) 부위의 염기변이

<96> 만성 C형간염의 치료를 위하여 인터페론을 사용하는 경우 인체의 C형간염바이러스의 유전자형에 따라 다른 치료효과를 보여, 인터페론을 사용하기 전에 체내

에 존재하는 C형간염바이러스의 유전자형을 조사하는 것이 필요하다. 유전자형을 밝혀내기 위하여 5'NCR의 염기변이를 조사하는 것이 유용하며, 본 실시예는 C형 간염바이러스의 5'NCR 부위의 염기변이를 분석하는 방법을 기술한 것이다.

<97> 1. RT PCR

<98> QIAamp viral RNA Mini kit(Qiagen, CA)를 사용하여 C형간염바이러스의 RNA를 혈청 0.14 ml 으로부터 추출하고, 이 중 10 μ l를 RT PCR 증폭에 사용한다.

<99> 0.2 mM dNTP, 0.4 μ M 프라이머 2, 10 μ l RNA를 함유한 반응용액을 65°C에서 5분간 반응후 열음에 1분간 방치한다. 이 반응액에 20 mM TrisHCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM DTT, 0.4 μ M 프라이머 1, 100 U SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase(Invitrogen, 18080-044), 20 U RNaseOUT (Invitrogen, 10777-019), 0.4 U Platinum Taq Polymerase(Invitrogen, 10966-026)을 혼합한 반응용액 25 μ l를 사용하여 다음의 조건으로 RT PCR 을 수행한다.

<100> 50°C 45분,

<101> 94°C 2분,

<102> 94°C 15초 55°C 15초 72°C 15초(35 cycles)

<103> 72°C 5분

<104> Template DNA 의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<105> GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGT (중간생략) ACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAG

(서열정보16)

<106> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 7과 8이 결합하는 부위들이다.

<107> 프라이머7(서열정보17). 5'- GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT - 3' (24 mer)

<108> 프라이머8(서열정보18). 5'- CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT - 3' (24 mer)

<109> 2. Nested PCR 및 제한효소절단

<110> 위 RT PCR 반응액을 1/50로 희석하여 그 중 2 μ l를 20mM TrisHCl(pH 8.4), 50mM KC1, 0.2 mM dNTP, 0.4U Platinum Taq Polymerase(Invitrogen, 10966-026), 프라이머 9와 10, 11과 12 또는 13과 14를 각각 10 pmol 씩을 함유한 반응용액 18 μ l를 사용하여 다음의 3가지 PCR반응 및 제한효소처리를 실시한다. 반응1에서는 프라이머 9와 10을, 반응2에서는 프라이머 11과 12를, 그리고 반응3에서는 프라이머 13과 14를 사용한다. 3가지 반응 모두 PCR 반응온도 및 시간은 다음과 같다.

<111> 94°C 5분,

<112> 94°C 30초 55°C 30초 72°C 30초(35 cycles)

<113> 72°C 5분

<114> 1) 반응①

<115> RT-PCR 반응액을 프라이머 9와 10을 이용하여 PCR을 수행한다. Template DNA

의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<116> CGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGCAGCCTCCAGGACCC ... (중간생략)

<117> ...CTGCTAGCCGAGTAGTGTGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGG (서열정보19)

<118> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 9와 10이 결합하는 부위들이다.

<119> 프라이머9(서열정보20). 5'- CGTCTAGCCATGGCGTTAGggatgATGAGTGT - 3' (32 mer)

<120> 프라이머10(서열정보21). 5'- CCCTATCAGGCAGTACCAACAAGGC - 3' (24 mer)

<121> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→ 3').

<122> CGTCTAGCCATGGCGTTAGggatgATGAGTGTCGCAGCCTCCAGGACCC ... (중간생략)

<123> GCAGATCGGTACCGCAATCcctacTACTCACAGCACGTCGGAGGTCTGGG ... (중간생략)

<124> ... CTGCTAGCCGAGTAGTGTGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGG(서열정보22)

<125> ... GACGATCGGCTCATCACAAACCCAGCGCTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCC(서열정보23)

<126> 소문자로 표기된 부위는 Fok1 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이다(7mer와 13mer). PCR 반응물을 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U 및 반응용액(50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT)

10ul 과 혼합하여 37°C에서 2시간, 그리고 45°C에서 2시간 동안 반응을 실시한다.

37°C에서 2시간 동안 FokI으로 먼저 절단한 다음, BstF5I을 넣어주어 45°C에서 2시간 동안 절단할 수도 있다.

<127> 2) 반응②

<128> RT-PCR 반응액을 프라이머 11과 12를 이용하여 PCR을 수행한다. Template DNA의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<129> GTGGTCTGCGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCC...(중간생략)

<130> ...CCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGRGTGGTRGCGAA (서열정보24)

<131> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 11과 12가 결합하는 부위들이다.

<132> 프라이머11(서열정보25). 5'- GTGGTCTGtccaacCGGTGAGTACACCGGAAT - 3' (32mer)

<133> 프라이머12(서열정보26). 5'- TTGCCRACCCAACRCTACTccaacggtcCGGCTAG - 3' (35 mer)

<134> R로 표기된 염기는 아데닌(A) 또는 구아닌(G)으로서, 각각의 염기가 함유된 두 가지 프라이머의 혼합물을 사용한다.

<135> PCR을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→3').

<136> GTGGTCTGtccaacCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCC ... (중간생략)

<137> CACCA GACagg t tgGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCTGCTGGCCCAGG ... (중간생략)

<138> ... CCCCGCAAGACTGCTAGCCGgaccgt tggaGTAGRGTTGGGTRGCGAA(서열정보27)

<139> ... GGGCGTTCTGACGATCGGcctggcaacctCATCRCAACCCARCGCTT(서열정보28)

<140> 소문자로 표기된 부위는 *MmeI* 및 *AvaII*에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이다(13mer, 18mer, 24mer 그리고 19mer). PCR 반응물을 *MmeI*(NEB R0637L) 1.5U, 50 uM SAM 및 1·X 반응용액(50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, pH 7.9) 10uL과 혼합하여 37°C에서 2시간 그리고 *AvaII*(NEB, R0153S) 1.5U를 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응을 실시한다. *MmeI*와 *AvaII*를 동시에 넣고 반응시킬 수도 있다.

<141> 3) 반응③

<142> RT-PCR 반응액을 프라이머 13과 14를 이용하여 PCR을 수행한다. Template DNA의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<143> GACIGGGTCCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGCGTGCCCCCCGC(서열정보29)

<144> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 13과 14가 결합하는 부위들이다.

<145> 프라이머13(서열정보30). 5'- GACIGGGTCCTggatgTCTTGGA - 3' (23 mer)

<146> 프라이머 14(서열정보31). 5' - GCGGGGGCACggatgCCCAAAT - 3' (22 mer)

<147> I로 표기된 염기는 이노신(Inosine)이다.

<148> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→ 3').

<149> GACIGGGTCCTggatgTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGcatccGTGCCCCGC(서열정보32)

<150> CTGICCCAGGAcc tacAGAACCTAGTTGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCgt aggCACGGGGCG(서열정보33)

<151> 소문자로 표기된 부위는 Fok1 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이다. 생성되는 절편은 3mer 두 가지, 13mer 두 가지 그리고 14mer 두 가지이다. PCR 반응물을 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U 및 반응용액(50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT) 10ul 과 혼합하여 37°C에서 2시간, 그리고 45°C에서 2시간 동안 반응을 실시한다. 37°C에서 2시간 동안 FokI으로 먼저 절단한 다음, BstF5I를 넣어주어 45°C에서 2시간 동안 절단할 수도 있다.

2. 정제 및 텔염과 MALDI-TOF 매스 스펙트로메트리

<153> 3가지 타입의 PCR 및 제한효소 절단반응액을 실시 예1과 동일한 방법으로 정

제하고 분자량을 측정한다.

<154> 반응 ①(표2), ②(표3) 그리고 ③(표4)에 의해 생성된 절편들의 크기는 다음의 표2 - 표4에 표기한 바와 같다. 표2 - 4에 나타낸 조견표에 의하여 절편들의 크기를 통해 C형간염바이러스의 유전형을 결정한다.

<155> [표 2]

<156>

Genotype	7 mer	13 mer
1a	2216.4	3983.6
1b	2216.4	3983.6
1c	2216.4	3983.6
3a	2216.4	3983.6
3b	2216.4	3983.6
3c	2216.4	3983.6
3d	2216.4	3983.6
3e	2216.4	3983.6
3f	2216.4	3983.6
6b	2216.4	3983.6
7a	2216.4	3983.6
7b	2216.4	3983.6
7c	2216.4	3983.6
2'	2216.4	3989.6
5a	2216.4	3989.6
1b	2216.4	3998.6
1d	2216.4	3998.6
1e	2216.4	3998.6
1f	2216.4	3998.6
2a	2216.4	3998.6
2b	2216.4	3998.6
2c	2216.4	3998.6
2d	2216.4	3998.6
2e	2216.4	3998.6
2'	2216.4	3998.6
4h	2216.4	3998.6
6a	2216.4	3998.6
7d	2216.4	3998.6
1b	2231.4	3967.6
4g	2231.4	3967.6
4k	2231.4	3967.6
2a	2231.4	3982.6
4a	2231.4	3982.6
4b	2231.4	3982.6
4c	2231.4	3982.6
4d	2231.4	3982.6
4e	2231.4	3982.6

4e'	2231.4	3982.6
4f	2231.4	3982.6
4f'	2231.4	3982.6

<157> [表 3]

<158>

Genotype	13 mer	18 mer	Genotype	14mer	19 mer
1a	4049.6	5556.6	2a	4337.8	5891.8
1b	4049.6	5556.6	2e	4337.8	5891.8
1c	4049.6	5556.6	4b	4337.8	5891.8
1d	4049.6	5556.6	4e'	4337.8	5891.8
1e	4049.6	5556.6	1a	4352.8	5875.8
1f	4049.6	5556.6	1c	4352.8	5875.8
6b	4049.6	5556.6	1d	4352.8	5875.8
7a	4049.6	5556.6	1e	4352.8	5875.8
7b	4049.6	5556.6	2a	4352.8	5875.8
4a	4049.6	5572.6	2b	4352.8	5875.8
6a	4064.6	5540.6	2c	4352.8	5875.8
7c	4064.6	5540.6	2d	4352.8	5875.8
7d	4064.6	5540.6	2'-1	4352.8	5875.8
4f'	4065.6	5541.6	2'-2	4352.8	5875.8
4e'	4064.6	5556.6	3a	4352.8	5875.8
4f	4065.6	5557.6	3b	4352.8	5875.8
4g	4065.6	5557.6	3d	4352.8	5875.8
5a	4080.6	5525.6	3e	4352.8	5875.8
3b	4080.6	5541.6	4c	4352.8	5875.8
4b	4080.6	5541.6	4d	4352.8	5875.8
4c	4080.6	5541.6	4f	4352.8	5875.8
4d	4080.6	5541.6	4f'	4352.8	5875.8
4e	4080.6	5541.6	4g	4352.8	5875.8
4h	4080.6	5541.6	6a	4352.8	5875.8
4k	4080.6	5541.6	6b	4352.8	5875.8
2d	4088.6	5515.6	7c	4353.8	5876.8
2b	4088.6	5530.6	1b	4368.8	5860.8
3f	4096.6	5526.6	1f	4368.8	5860.8
2a	4104.6	5500.6	3c	4368.8	5860.8
2c	4104.6	5500.6	3f	4368.8	5860.8
2e	4104.6	5500.6	4a	4368.8	5860.8
2'	4104.6	5500.6	4e	4368.8	5860.8
2'	4104.6	5500.6	4h	4368.8	5860.8
3a	4111.6	5510.6	4k	4368.8	5860.8
3c	4111.6	5510.6	5a	4368.8	5860.8
3d	4111.6	5510.6	7a	4368.8	5860.8
3e	4111.6	5510.6	7b	4368.8	5860.8
			7d	4368.8	5860.8

<159> [표 4]

<160>

HCV nt-140 Forward			HCV nt-140 Reverse			nt-140 Intra(14mer)		
Genotype	7 mer	13 mer	Genotype	7 mer	13 mer	Genotype	Forward	Reverse
6a	2191.4	4053.6	2'-2	2144.4	4110.6	2d	4247.8	4392.8
6b	2191.4	4053.6	4f'	2144.4	4110.6	2a	4247.8	4408.8
7d	2191.4	4053.6	5a	2144.4	4110.6	2c	4247.8	4408.8
1f	2191.4	4062.6	1a	2144.4	4125.6	2e	4247.8	4408.8
1a	2191.4	4078.6	1b	2144.4	4125.6	2'-1	4247.8	4408.8
1b	2191.4	4078.6	1c	2144.4	4125.6	2'-2	4247.8	4408.8
1e	2191.4	4078.6	1d	2144.4	4125.6	1d	4248.8	4368.8
4a	2191.4	4078.6	1e	2144.4	4125.6	1f	4287.8	4368.8
4b	2191.4	4078.6	1f	2144.4	4125.6	3a	4256.8	4414.8
4e'	2191.4	4078.6	6a	2144.4	4125.6	3c	4256.8	4414.8
7a	2191.4	4078.6	6b	2144.4	4125.6	3e	4256.8	4414.8
7b	2191.4	4078.6	7a	2144.4	4125.6	2b	4562.0	4714.0
7c	2191.4	4078.6	7b	2144.4	4125.6	1a	4272.8	4368.8
3d	2200.4	4044.6	7c	2144.4	4125.6	1b	4272.8	4368.8
4g	2200.4	4044.6	7d	2144.4	4125.6	1c	4272.8	4368.8
4k	2200.4	4053.6	3a	2159.4	4078.6	1e	4272.8	4368.8
3b	2200.4	4069.6	3c	2159.4	4078.6	4a	4272.8	4368.8
3c	2200.4	4069.6	3d	2159.4	4078.6	4e'	4272.8	4368.8
3e	2200.4	4069.6	3e	2159.4	4078.6	7a	4272.8	4368.8
4e	2206.4	4037.6	3b	2159.4	4094.6	7b	4272.8	4368.8
1b	2206.4	4062.6	3f	2159.4	4094.6	3d	4570.0	4744.0
1c	2206.4	4062.6	4c	2159.4	4094.6	3f	4546.0	4744.0
2'-2	2206.4	4062.6	4d	2159.4	4094.6	3b	4272.8	4384.8
4f'	2206.4	4062.6	4e	2159.4	4094.6	4b	4272.8	4384.8
5a	2206.4	4062.6	4f	2159.4	4094.6	4c	4272.8	4384.8
1b	2215.4	4053.6	4h	2159.4	4094.6	4d	4272.8	4384.8
2a	2215.4	4053.6	4k	2159.4	4094.6	4f'	4272.8	4384.8
2b	2215.4	4053.6	4a	2159.4	4109.6	5a	4272.8	4384.8
2c	2215.4	4053.6	4e'	2159.4	4109.6	4e	4296.8	4384.8
2d	2215.4	4053.6	4b	2184.4	4070.6	4g	4586.0	4714.0
2e	2215.4	4053.6	4g	2184.4	4070.6	4k	4287.8	4384.8
2'-1	2215.4	4053.6	2a	2193.4	4061.6	4f	4562.0	4384.8
3f	2215.4	4053.6	2b	2193.4	4061.6	4h	4562.0	4384.8
4c	2215.4	4053.6	2e	2193.4	4061.6	6a	4586.0	4698.0
4d	2215.4	4053.6	2d	2193.4	4076.6	6b	4586.0	4698.0
4f	2215.4	4053.6	2c	2209.4	4046.6	7d	4586.0	4698.0
4h	2215.4	4053.6	2'-1	2209.4	4046.6	1b	4288.8	4353.8
3a	2216.4	4054.6	2c	2209.4	4030.6	7c	4288.8	4353.8
1d	2215.4	4078.6						

【발명의 효과】

<161>

본 발명은 기존의 염기변이 분석방법이 가지고 있었던 오류에 의한 잘못된

분석을 검증할 수 있고, 32개 염기범위 이내로 인접한 여러 염기의 변이를 동시에 조사할 수 있다. 특별히, 염기의 변이를 보이는 생명체의 유전형이 여러 가지로 존재하는 경우, 서로 다른 위치의 염기변이가 한 유전형에 동시에 존재하는지, 아니면 2가지 이상의 유전형에 존재되어 존재하는지를 구별할 수 있다. 또한, 결실 또는 삽입에 의한 유전변이도 검출할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

- a) 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 이용하여 특정 폴리뉴클레오타이드를 증폭하는 단계;
- b) 상기 증폭된 특정 폴리뉴크레오타이드를 제한효소로 절단하여 2 - 32개 염기의 크기를 가지면서 변이서열을 포함하는 2가지 이상의 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드 절편을 생성하는 단계; 및
- c) 상기 절단된 절편의 분자량을 측정하는 단계를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

서로 다른 2개 이상의 염기변이 중 한 변이는 하나의 폴리뉴클레오타이드 절편에만 존재하고, 또 다른 뉴클레오타이드 절편에는 2개 이상의 염기변이를 모두 포함하도록 절단하는 유전자 변이 분석방법

【청구항 3】

- a) 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 이용하여 특정 폴리뉴크레오타이드를 증폭하는 단계;
- b) 제1의 제한효소 반응이 진행되는 동안 제2의 제한효소의 반응이 진행되지 않도록 한 후 제2의 제한효소가 반응하도록 하여 상기 증폭된 특정 폴리뉴크레오타

이드를 절단하는 단계; 및

c) 상기 절단된 절편의 분자량을 측정하는 단계를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 4】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기의 포워드 프라이머는 프라이머 결합서열1, 제한효소인자서열, 및 프라이머결합서열2를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

상기의 포워드 프라이머는 서열정보 2, 7, 12, 20, 25 및 30 으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 6】

제 1 항 또는 제 3항에 있어서,

상기의 제한효소 처리단계는 서로 다른 최적온도를 갖는 제한효소를 이용하는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서,

상기의 제한효소는 Fok1, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 및 Bae I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 낮은 최적온도를 갖는 제한효소와 BstF5 I,

Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 및 Apo I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 높은 최적온도를 갖는 제한효소인 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 8】

제 3 항에 있어서,
상기의 제한효소의 절단에 의해 생성된 절편은 변이서열을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 9】

제 3 항 또는 제 8 항에 있어서,
제한효소의 절단에 의해 생성된 절편의 염기 수는 2-32인 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 10】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,
상기의 증폭하는 폴리뉴클레오타이드는 B형간염바이러스 증합효소의 활성부위인 타이로신-메티오닌-아스파테이트-아스파테이트(YMDD)부위를 포함하는 유전자 변이 분석방법

【청구항 11】

제 1 항 또는 제3 항에 있어서,
상기의 증폭하는 폴리뉴클레오타이드는 C형간염바이러스 5'-비코딩지역(NCR)

부위를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 12】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기의 증폭하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 마스핀(maspin) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 또는 3597번째 염기부위를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

【청구항 13】

프라이머 결합서열1, 제한효소인자서열, 및 프라이머결합서열을 포함하되 제한효소인자서열을 인지하는 2개 이상의 제한효소에 의해 절단된 폴리뉴클레오타이드 절편이 변이서열을 포함하고 절편의 크기가 2 - 32개 염기의 크기를 갖도록 구성된 유전자변이분석용 프라이머.

【청구항 14】

제 13 항에 있어서,

상기의 포워드 프라이머는 서열정보2, 7, 12, 20, 25 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 유전자 변이분석용 프라이머.

【청구항 15】

제 13 항에 있어서,

상기의 제한효소들은 서로 같은 또는 서로 다른 최적온도를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자변이분석용 프라이머.

【청구항 16】

제 13 항 또는 제 15 항에 있어서,
상기의 제한효소들은 서로 다른 최적온도를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자
변이분석용 프라이머.

【청구항 17】

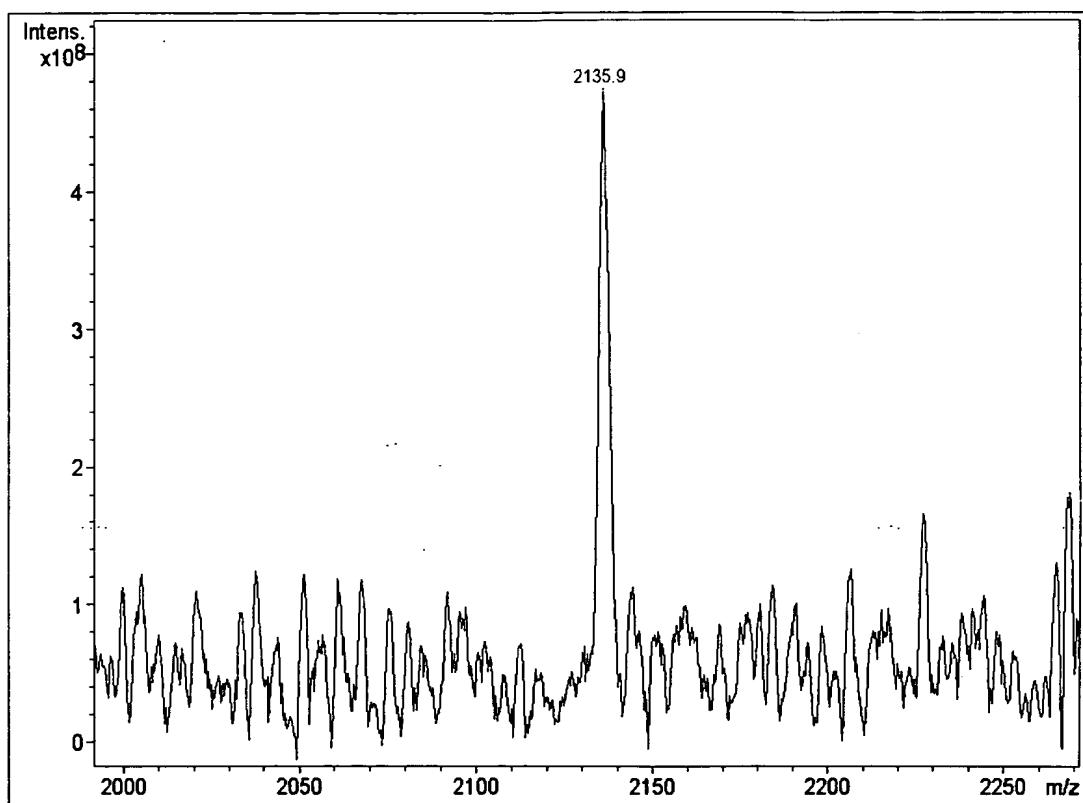
제 16 항에 있어서,
상기의 제한효소는 FokI, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 및 Bae I으
로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 낮은 최적온도를 갖는 제한효소와 BstF5 I,
Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 및 Apo I으로 이루어진 군
으로부터 선택된 하나의 높은 최적온도를 갖는 제한효소인 것을 특징으로 하는 유
전자 변이 분석용 프라이머.

【청구항 18】

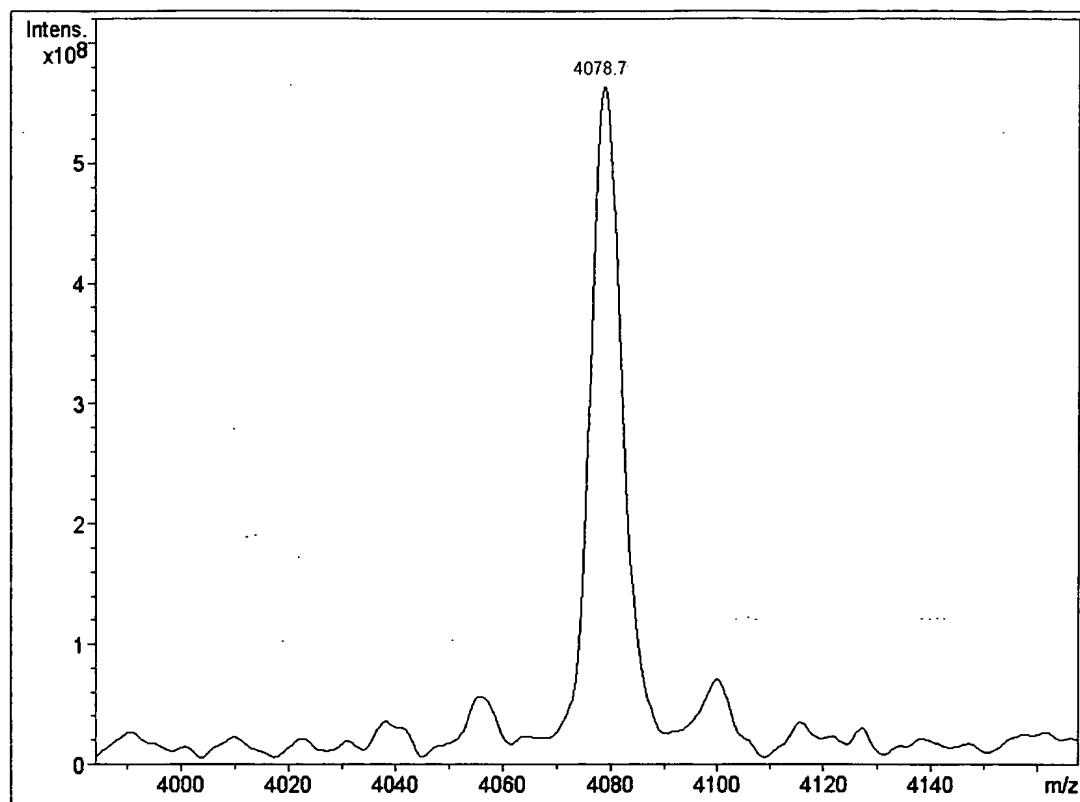
제 13항 또는 제 14 항에 있어서,
상기의 프라이머는 인간 마스핀(maspin) 유전자의 4번째 인트론의 2741번째
또는 3597번째 염기의 변이분석, 라미부딘 내성 B형 간염바이러스 변위분석 또는
C형 간염바이러스의 유전자형 변이분석에 사용되는 것을 특징으로 하는 유전자 변
이분석용 프라이머.

【도면】

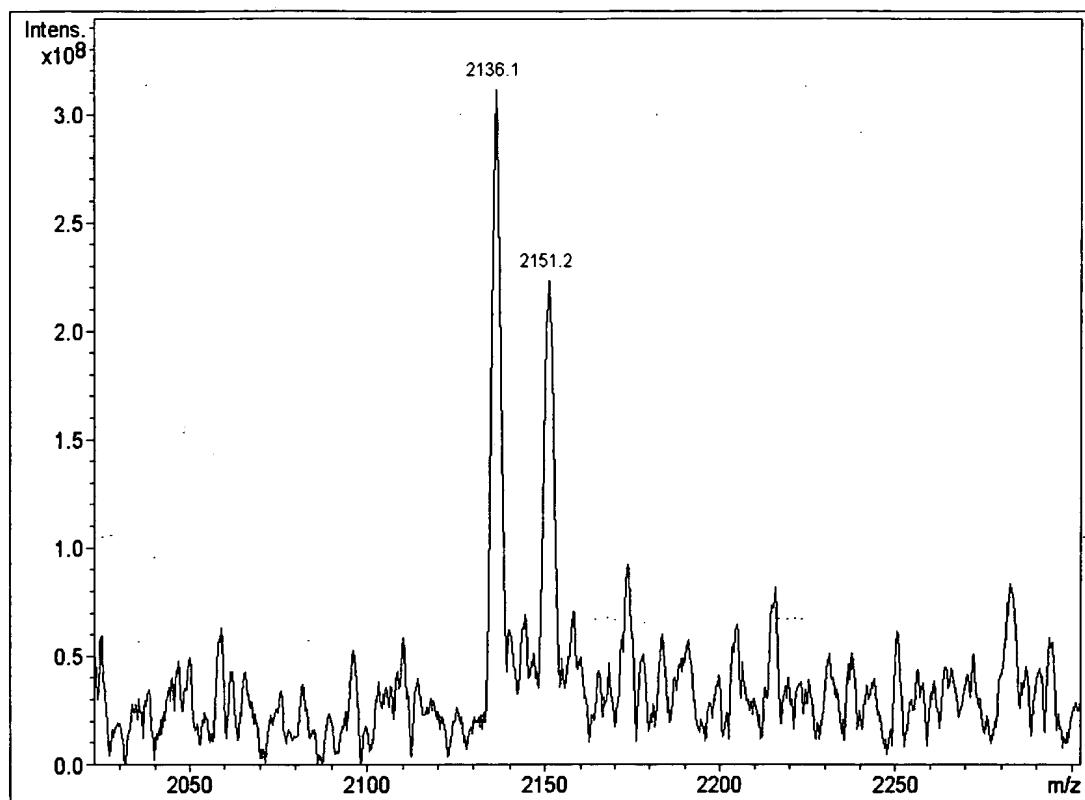
【도 1】



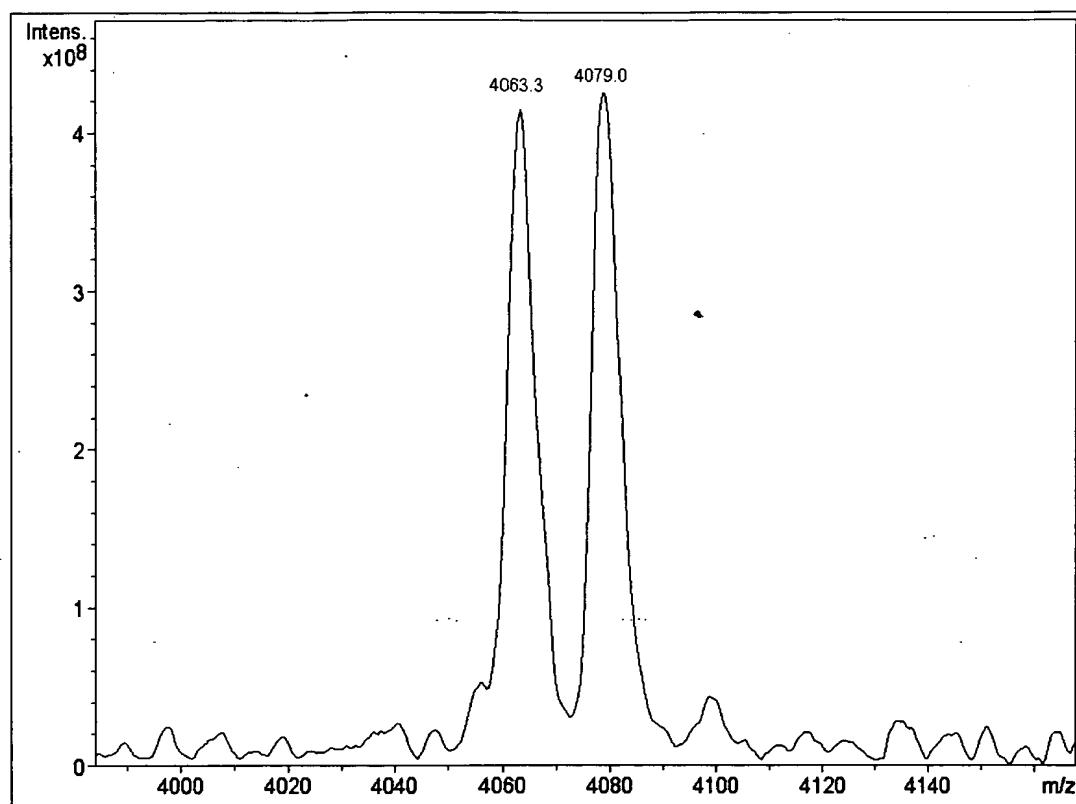
【도 2】



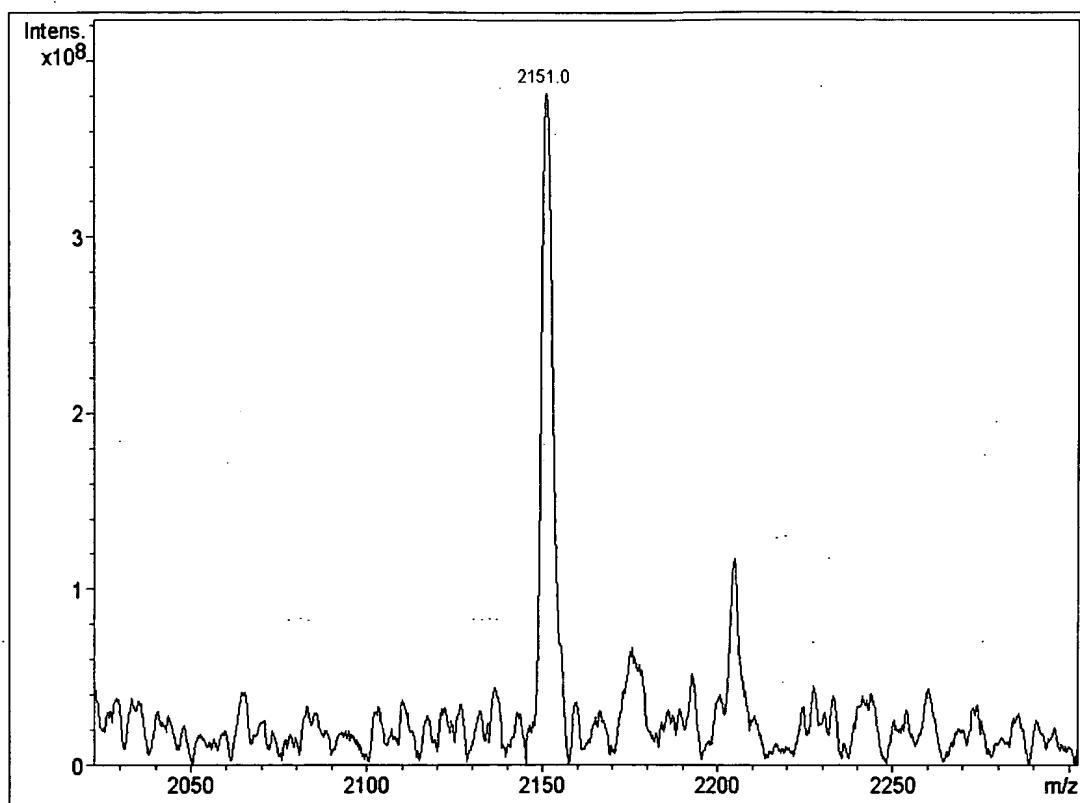
【도 3】



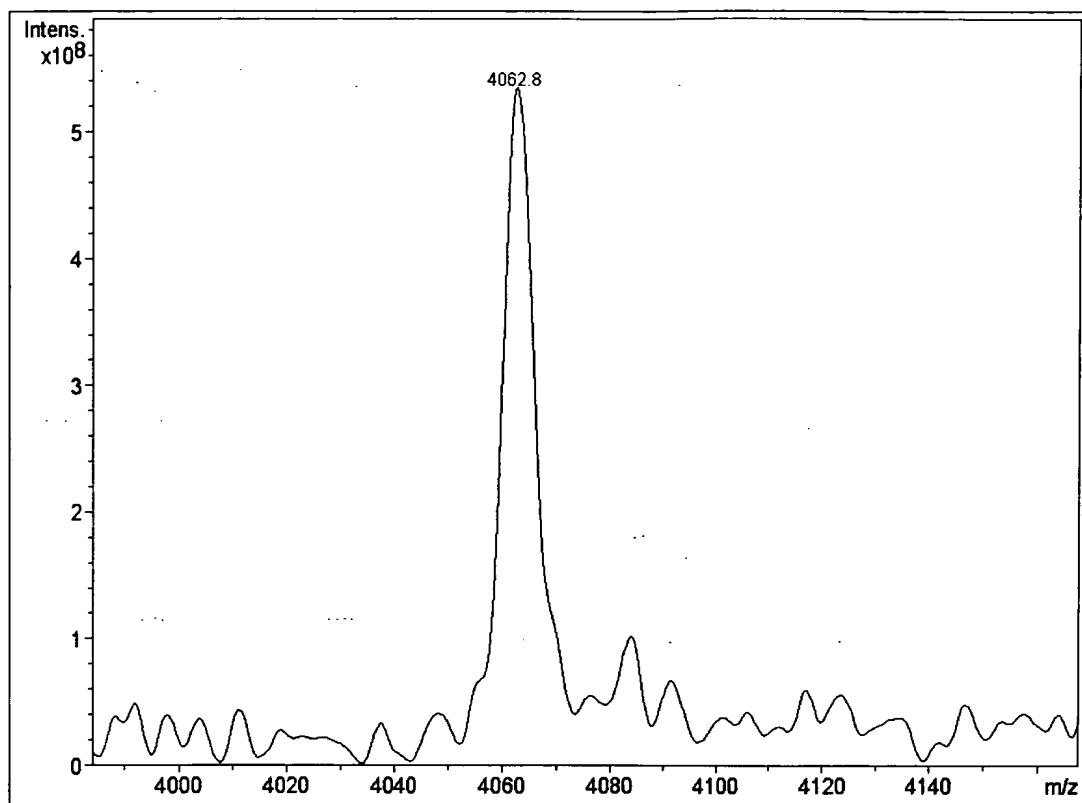
【도 4】



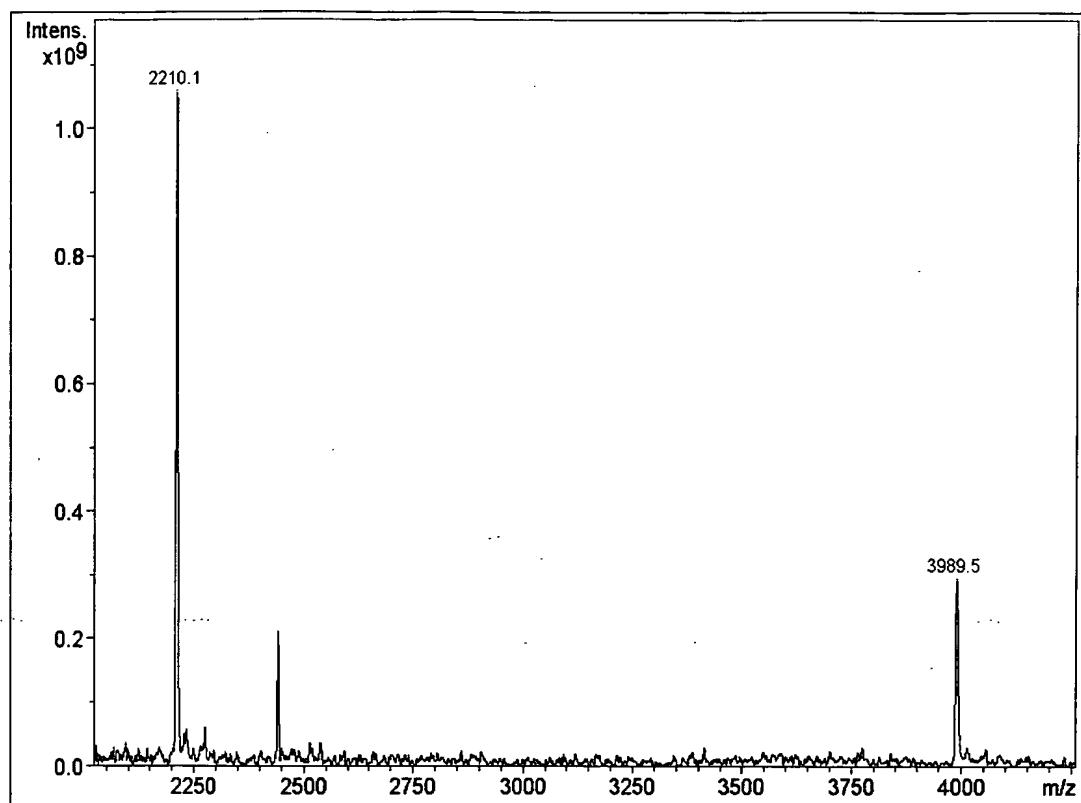
【도 5】



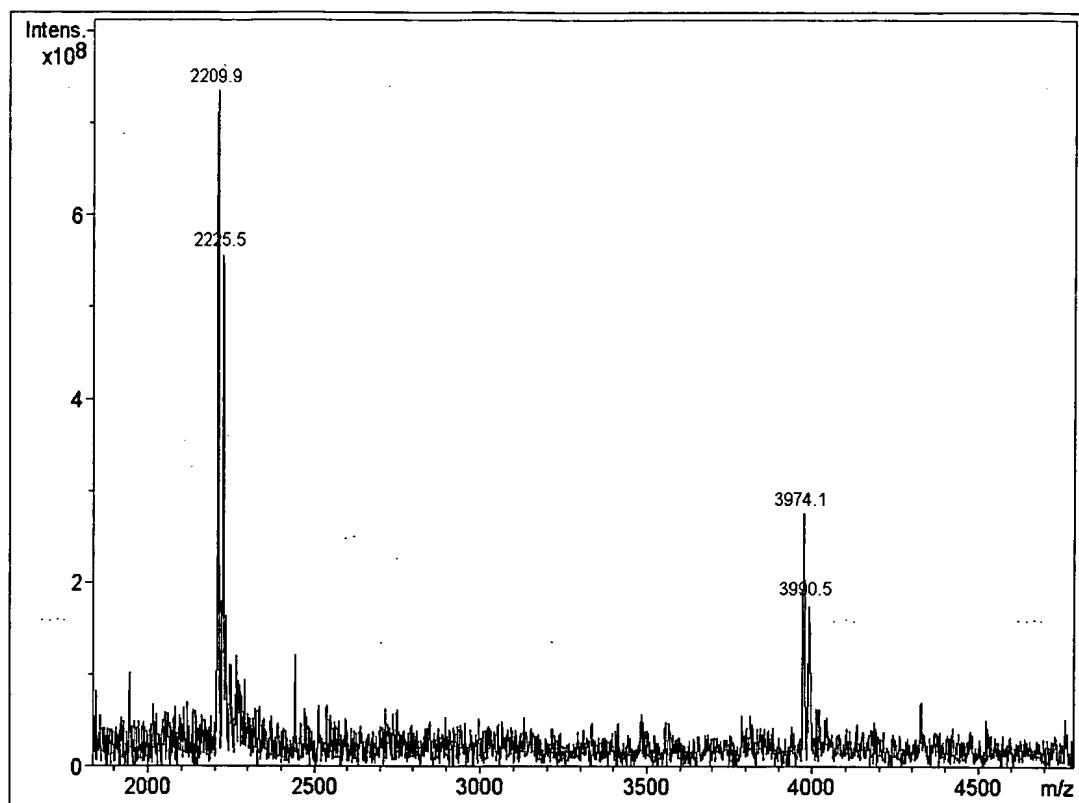
【도 6】



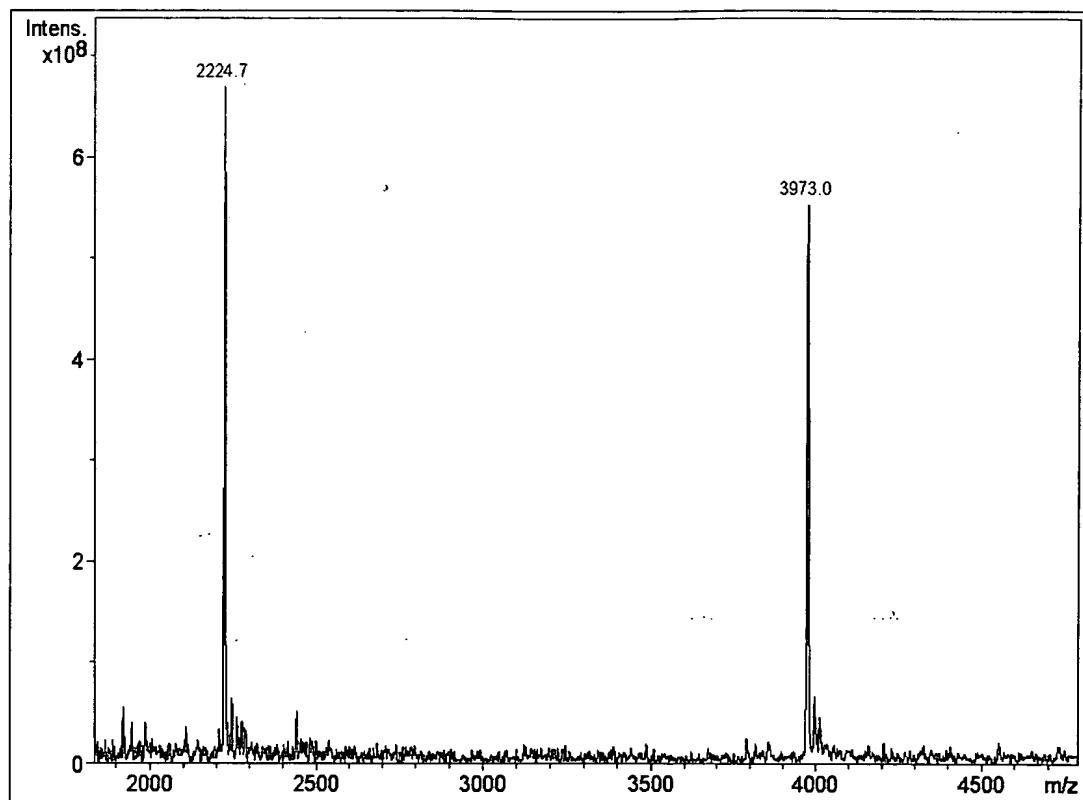
【도 7】



【도 8】



【도 9】



【서열목록】

<110> GeneMatrix Inc.; Yoo, Wang Don
<120> Method for detecting base mutation
<130> 03DPA158
<150> KR2002-0063832
<151> 2002-10-18
<160> 33
<170> Kopatent In 1.71
<210> 1
<211> 69
<212> DNA

<213>	Homo sapiens					
<400>	1					
gtttcacttg	ataaagcaat	aaaatgctat	tcacagctgc	atgaggctac	acccttctt	60
tgaatgcag						69
<210>	2					
<211>	34					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Forward primer for 4th intron region of maspin gene					
<400>	2					
tcacttgata	aagcaataaa	aggatggcta	ttca			34
<210>	3					
<211>	28					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	Reverse primer for 4th intron region of maspin gene					
<400>	3					
cattcaaaaag	aagggtgtag	cctcatgc				28
<210>	4					
<211>	68					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	Resulting PCR Fragment					
<400>	4					
tcacttgata	aagcaataaa	aggatggcta	ttcactagct	gcatgaggct.	acacccttct	60
tttgaatg						68
<210>	5					
<211>	68					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	Resulting PCR Fragment					
<400>	5					
agtgaactat	ttcggttattt	tcctaccgat	aagtgatcga	cgtactccga	tgtgggaaga	60
aaacttac						68

<210> 6
<211> 73
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
ctggaggatt atccttgcag gcttgatatg aagcttggaa tttctccca aagagattta 60
gttaacaggc aaa 73
<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer for 4th intron region of maspin gene
<400> 7
gagtttattc ctgcaggct tggatgatat gaag 34
<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Reverse primer for 4th intron region of maspin gene
<400> 8
gcctgttaac taaatcttt tggggagaa 29
<210> 9
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Resulting PCR Fragment
<400> 9
gagtttattc ctgcaggct tggatgatat gaagcttga aatttctccc caaagagatt 60
tagtttaacag gc 72
<210> 10
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Resulting PCR Fragment

<400> 10

ctcataatag gaacgtccga acctactata cttcgaaact ttaaagaggg gtttctctaa 60

atcaattgtc cg 72

<210> 11

<211> 60

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 11

ttcccccact gttggcttt cagttatatg gatgatgtgg tattggggc caagtctgta 60

60

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for HBV

<400> 12

ttcccccact gttggctgg atgtcagttt t 31

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for HBV

<400> 13

tacagacttg gccccaata ccacatgatc 30

<210> 14

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Resulting PCR fragment

<400> 14

ttcccccact gttggctgg atgtcagttt tatggatcat gtggattgg gggccaagtc 60

tgta 64

<210> 15

<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Resulting PCR fragment
<400> 15
aagggggtga caaacggacc tacagtcaat atacctagta caccataacc cccggttcag 60
acat 64
<210> 16
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 5'Noncoding region of HCV
<400> 16
gcagaaagcg tctagccatg gcgttagtat gagtactgcc tgatagggtg cttgcgag 58
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer of 5'NCR of HCV
<400> 17
gcagaaagcg tctagccatg gcgt 24
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Reverse primer of 5'NCR of HCV
<400> 18
ccctatcagg cagtaccaca agg 24
<210> 19
<211> 106
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Resulting PCR fragment

<400> 19

cgtctagcca tggcgtagg gatgatgagt gtcgtgcagc ctccaggacc cctgctagcc 60
gagtagtggtt gggtcgcgaa aggcccttgtg gtactgcctg ataggg 106

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer

<400> 20

cgtctagcca tggcgtagg gatgatgagt gt 32

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer

<400> 21

ccctatcagg cagtaccaca aggc 24

<210> 22

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Resulting PCR fragment

<400> 22

cgtctagcca tggcgtagg gatgatgagt gtcgtgcagc ctccaggacc cctgctagcc 60

gagtagtggtt gggtcgcgaa aggcccttgtg gtactgcctg ataggg 106

<210> 23

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Resulting PCR fragment

<400> 23

gcagatcggt accgcaatcc ctactactca cagcacgtcg gaggtccctgg ggacgatcgg 60

ctcatcacaa cccagcgctt tccggaacac catgacggac tatccc	106
<210> 24	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Template DNA	
<400> 24	
gtggtctgctgcaaccggta gtacaccgga attgccagga cgaccgggtc ccccccgaag	60
actgctagcc gagtagrattt gggtrgcaaa	90
<210> 25	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Forward primer	
<400> 25	
gtggtctgtcaaccggta gtacaccgga at	32
<210> 26	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Reverse primer	
<400> 26	
ttcgcraccc aacrctactc caacggtccg gctag	35
<210> 27	
<211> 99	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Resulting PCR fragment	
<400> 27	
gtggtctgtcaaccggta gtacaccgga attgccagga cgaccgggtc ccccccgaag	60
actgctagcc ggaccgttgg agtagrattt ggtrgcaaa	99
<210> 28	
<211> 99	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Resulting PCR fragment
<400> 28
caccagacag gttggccact catgtggcct taacggtcct gctggccag gggggcgttc 60
tgacgatcggtt cctggcaacc tcatcrcaac ccarcgctt 99
<210> 29
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Template DNA
<220>
<221> modified_base
<222> (4)
<223> i
<400> 29
gacngggtcc tttcttggat caacccgctc aatgcctgga gattttggcg tgccccgc 59
<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer
<220>
<221> modified_base
<222> (4)
<223> i
<400> 30
gacngggtcc tggatgtctt gga 23
<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Reverse primer

<400> 31
gcggggcac ggatgccaa at 22
<210> 32
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Resulting PCR fragment
<220>
<221> modified_base
<222> (4)
<223> i
<400> 32
gacngggtcc tggatgtctt ggatcaaccc gctcaatgcc tggagatttggccatccgtg 60
cccccgcc 67
<210> 33
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Resulting PCR fragment
<220>
<221> modified_base
<222> (4)
<223> i
<400> 33
ctgncccgagg acctacagaa cctagttggg cgagttacgg acctctaaac ccgtaggcac 60
ggggcg 67